

**In vitro production of heart valve by providing carrier with fibroblasts and/or myofibroblasts and then endothelial cells, followed by treatment in pulsating flow chamber of bioreactor****Patent number:** DE19919625**Publication date:** 2000-11-30**Inventor:****Applicant:** HOERSTRUP SIMON PHILIPP (CH); ZUEND GREGOR (CH)**Classification:**- **international:** A61F2/24; A61L27/00; A61L33/00- **european:** A61F2/24D2; A61L27/18; A61L27/38; A61L27/50E**Application number:** DE19991019625 19990429**Priority number(s):** DE19991019625 19990429**Also published as:**

EP1077072 (A2)



EP1077072 (A3)



EP1077072 (B8)



EP1077072 (B1)

[Report a data error here](#)**Abstract of DE19919625**

In vitro production of a homologous heart valve involves: (i) colonizing a biodegradable carrier with homologous fibroblasts and/or myofibroblasts so as to give a connective tissue matrix; (ii) colonizing the matrix with endothelial cells; (iii) introducing the matrix into a pulsating flow chamber (e.g. in a bioreactor) where it is subjected to a (dis)continuous flow rate. An Independent claim is also included for a homologous heart valve with a connective tissue inner core covered with a layer of endothelial cells, the core having a collagen density of 43-55%, based on the matrix.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND  
  
DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**  
(10) **DE 199 19 625 A 1**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 61 F 2/24**  
A 61 L 27/00  
A 61 L 33/00

(21) Aktenzeichen: 199 19 625.7  
(22) Anmeldetag: 29. 4. 1999  
(43) Offenlegungstag: 30. 11. 2000

(71) Anmelder:

Hoerstrup, Simon Philipp, M.D., Zürich, CH; Zünd,  
Gregor, Dr., Herrliberg, CH

(74) Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,  
80538 München

(72) Erfinder:

Erfinder wird später genannt werden

(56) Entgegenhaltungen:

DE	198 28 726 A1
US	58 55 610 A
US	56 13 982 A
WO	96 40 889 A1

CURTIL, PEGG u. WILSON: Repopulation of freeze-dried porcine valves with human fibroblasts and endothelial cells. In: Journal of Heart Valve Disease, Vol.6, May 1997, No.3, S.296-306;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) In-vitro-Verfahren zum Herstellen einer homologen Herzklappe

(57) An Herzklappendysfunktion leidenden Patienten wird bisher entweder eine mechanische Herzklappe oder eine biologische Klappe von einem menschlichen oder nicht-menschlichen Spender implantiert. Diese Klappen weisen jedoch erhebliche Nachteile auf, wie z. B. die Notwendigkeit einer lebenslangen Antikoagulation mit der Gefahr hemorrhagischer Komplikationen, eine Degenerationsneigung sowie die Gefahr einer Immunreaktion. Außerdem kann keine der bisher bekannten Klappen sich einem z. B. durch Wachstum verändernden Herzen anpassen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können homologe Herzklappen zur Verfügung gestellt werden, die aus einem im wesentlichen bindegewebigen Kern und einer superfiziellem Endothellschicht aufgebaut sind und damit einen der natürlichen Herzklappe analogen Aufbau haben. Die Nachteile der bekannten Herzklappen werden durch die erfindungsgemäßen Herzklappen vermieden.

**DE 199 19 625 A 1**

**DE 199 19 625 A 1**

## Beschreibung

Jedes Jahr versterben alleine in den USA ca. 20.000 Patienten an den Folgen einer Herzklappendysfunktion, und mehr als 60.000 Patienten sind wegen einer bereits erkannten Dysfunktion gezwungen, ein oder mehrere Herzklappen operativ ersetzen zu lassen. Als Ersatz für die eigene Herzklappe kommen entweder mechanische oder biologische Klappenprothesen (Xenografts) in Frage, seltener werden kryopreservede oder glutaraldehydfixierte Homografts verwendet.

Mechanische Klappenprothesen führen jedoch oft zu Fremdkörperreaktionen mit thromboembolischen Komplikationen, die durch die mit der künstlichen Herzklappe veränderten Strömungsverhältnisse im Herzen begünstigt werden. Daher ist eine lebenslange Antikoagulation des betroffenen Patienten erforderlich, die zu einer permanent erhöhten Blutungsgefahr führt. Eine weitere, oft lebensbedrohliche Komplikation bei Patienten mit einer mechanischen Herzklappe sind Infektionen.

Bei den Xenografts handelt es sich meistens um Schweineklappen, die mit Glutaraldehyd behandelt sind. Schweineklappenprothesen können mit guten Ergebnissen bei älteren Patienten eingesetzt werden, neigen aber zur Degeneration nach nur ca. 12 bis 15 Jahren, so daß sie für junge Leute in der Regel nicht in Frage kommen. Weiterhin besteht bei Schweineklappenprothesen im Vergleich zum gesunden Herzen eine erhöhte Infektionsgefahr. Darüber hinaus neigen Schweineklappen zur Calcifizierung, weshalb sie zum Einsatz bei Kindern und jungen Leuten, die einen erhöhten Calciumstoffwechsel aufweisen, ungeeignet sind. Schließlich stellen sie ebenfalls körperfremdes Gewebe dar, das mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vom körpereigenen Immunsystem als fremd erkannt wird und damit lebensbedrohliche Immunprozesse auslösen kann.

Als dritte Möglichkeit stehen Homografts, d. h. aus humanen Spendern isolierte, fixierte Herzklappen, zur Verfügung. Homografts sind zwar gegen Infektionen relativ resistent, stellen jedoch ebenfalls körperfremdes Gewebe dar, das mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit Immunreaktionen hervorruft. Darüber hinaus neigen Homografts ebenso wie Schweineklappenprothesen zur Calcifizierung und unterliegen daher einer erheblichen Degeneration, die in der Regel eine Reoperation nach 7 bis 12 Jahren erforderlich macht. Homografts stellen darüber hinaus in nur äußerst begrenztem Umfang zur Verfügung.

Neben dem bereits beschriebenen Nachteilen der bisher als Klappenersatz verwendeten Klappenprothesen, d. h. der Auslösung von Immunreaktionen, der erhöhten Infektionsgefahr, der Gefahr thromboembolischer Prozesse und der Degenerationsneigung, ist allen bisher bekannten Klappen gemeinsam, daß sie aus anorganischem Material oder fixiertem organischen Material bestehen und ihnen daher wichtige Eigenschaften lebender Matrix, z. B. die Fähigkeit zu Reparationsprozessen, zur Rekonfiguration oder zum Wachstum fehlen. Daraus folgt u. a., daß bei kindlichen Klappenzentren bisher regelmäßig Reoperationen in Kauf genommen werden müssen. Zusätzlich zu dem jeder Herzoperation inhärenten Risiko steigt jedoch mit jeder Reoperation das Letalitätsrisiko, da durch die vorangegangenen Operationen erhebliche Verwachsungen im Thorax auftreten.

Es besteht daher ein dringender Bedarf für einen Herzklappenersatz, der die zuvor beschriebenen Nachteile vermeidet. Zu diesem Zweck ist bereits vorgeschlagen worden, künstliche Herzklappen durch "Tissue Engineering" herzustellen. Das "Tissue Engineering" befaßt sich mit der Entwicklung "biohybrider" Implantate, die im Körper zu Ge-

ben oder gar zu ganzen Organsystemen heranwachsen. Zuerst fanden die Techniken des "Tissue Engineering" im Bereich der Hauttransplantation Anwendung. Inzwischen hat sich ihre Applikation auf andere Gewebe, wie Leber, Knoorpel, Knochen und Trachea sowie intestinale und urologische Gewebe und Blutgefäße erweitert. Auch zur Herstellung biohybrider Herzklappen in Form von einzelnen Klappensegeln sind bereits beschrieben worden; die durch "Tissue Engineering" hergestellten Herzklappensegel hatten jedoch bisher den Nachteil, daß sie inadäquate, nicht ausreichende bindegewebige Strukturen aufwiesen und daher den im Herzen herrschenden Strömungsverhältnissen nach Auflösung der biodegradablen Trägerstruktur nicht hätten standhalten können.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren zum Herstellen einer künstlichen homologen Herzklappe zur Verfügung zu stellen, mit dem Herzklappenprothesen erzeugt werden können, die den *in vivo* herrschenden Strömungsverhältnissen gewachsen sind.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch ein in vitro-Verfahren zum Herstellen einer homologen Herzklappe gelöst, das die folgenden Schritte umfaßt:

- Bereitstellen eines biologisch abbaubaren Trägers,
- Besiedeln des Trägers mit homologen Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zur Ausbildung einer bindegewebigen Matrix,
- Besiedeln des Trägers/der Matrix mit Endothelzellen
- Einbringen des Trägers/der Matrix in eine pulsatile Flusskammer, in der er/sie steigenden Flussraten ausgesetzt werden kann, und
- kontinuierliches oder diskontinuierliches Erhöhen der Flussrate.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können homologe Herzklappen hergestellt werden, die auf Grund eines ausgeprägten bindegewebigen Kernes mit naturnahem Kollagen-, Elastin- und Glycosaminanteil zur Implantation beim menschlichen Patienten geeignet sind. Das Verfahren soll im folgenden näher erläutert werden.

In der folgenden Beschreibung bedeutet der Terminus "Träger" eine azelluläre Struktur, die, wie unten genauer erläutert wird, entweder aus synthetischen Fasern oder einem azellulären Bindegewebsgerüst besteht. Der Begriff "Matrix" bezeichnet eine bindegewebige Struktur, die neben Fibroblasten und Myofibroblasten typische Bestandteile einer Extrazellulärmatrix, nämlich Kollagen, Elastin und Glycosaminoglycane enthält. Mit Matrix bezeichnete Strukturen enthalten typischerweise keine Trägerbestandteile mehr. Die Übergangsstadien zwischen Träger und Matrix werden durch die Doppelbezeichnung "Träger/Matrix" beschrieben.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zunächst ein biologisch abbaubarer Träger bereitgestellt. Das Trägermaterial soll dabei einerseits eine gewisse Zeitlang stabil sein, um eine ausreichende Besiedlung bzw. Durchdringung mit Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zu ermöglichen und die Ausbildung einer bindegewebigen Matrix erreichen zu können, andererseits innerhalb einer vertretbaren Zeit, die jedenfalls kleiner ist, als die Zeit, die die Bildung der homologen Klappenprothese in Anspruch nimmt, insgesamt hydrolytisch aufgelöst werden können. Es ist bevorzugt, daß der hydrolytische Abbau nach ca. 8 Tagen beginnt; er sollte in der Regel nach 4 bis 6 Wochen abgeschlossen sein. Bei dem Trägermaterial handelt es sich bevorzugt um eine aus Polymerfasern aufgebaute Struktur, um eine poröse Polymerstruktur oder ein azelluläres biologisches Gewebe. Beispiele für biologisch abbaubare Trägermaterialien sind Polyglycolsäure (PGA), Polymilchsäure

(PLA), Polyhydroxyalkanoat (PHA) und Poly-4-Hydroxybutyrat (P4HB). Diese Polymere können sowohl rein als auch in Mischungen aus zwei oder mehreren der genannten Substanzen oder Mischungen dieser Substanzen mit weiteren biologisch abbaubaren Polymeren verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Mischpolymer aus 85% PGA und 15% PLA verwendet. Idealerweise ist der biologisch abbaubare Träger in der Form der gewünschten Herzklappe vorgeformt. Beispiele für mögliche Herzklappenformen sind in Abb. 1 angegeben.

Es hat sich als sinnvoll erwiesen, Träger mit einer Polymerdichte von ca. 40 bis 120 mg/cm<sup>3</sup> zu verwenden. Unterhalb von 40 mg/cm<sup>3</sup> ist das Polymergewebe zu labil, überhalb von 120 mg/cm<sup>3</sup> ist das Gewebe zu dicht, um das Eindringen von Fibroblasten innerhalb eines vertretbaren Zeitraums zuzulassen. In bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Dichte des biologisch abbaubaren Trägers 50 bis 80 mg/cm<sup>3</sup>, besonders bevorzugt 70 mg/cm<sup>3</sup>. Von den Erfindern wurde mit guten Ergebnissen ein polymerer Träger der Fa. Albany International Research, Mensville, MA, USA, mit einer Dichte von ca. 70 mg/cm<sup>3</sup> verwendet. Die Fasern des Trägers können einen Durchmesser von 6 bis 20 µm haben, bevorzugt 10 bis 18 µm. Es sind jedoch auch Gewebe mit anderen Faserstärken denkbar, die jedoch einerseits dem Träger eine gewisse Stabilität verleihen müssen, andererseits die Besiedelung und Durchdringung des Trägers mit Fibroblasten oder Myofibroblasten zulassen müssen. Weiterhin können poröse (schwammartige) Polymerformen verwendet werden. Hier haben sich Porengrößen von 80–240 µm als bevorzugt erwiesen. Die Poren können durch die sogenannte "Salt-Leaching" Technik erzielt werden, die dem Fachmann bekannt ist.

Statt eines synthetischen Trägers, wie zuvor beschrieben, ist die Verwendung eines azellulären Bindegewebsgerüstes denkbar. So könnte beispielsweise eine Schweineklappe in ein immunologisch neutrales Gewebe umgewandelt werden (Bader et al., Eur. J.-Cardiothorac. Surg. 14, 279, 1998), das anschließend mit homologen Zellen besiedelt werden könnte.

Der biologisch abbaubare Träger wird zunächst mit einer Fibroblastenpopulation inkubiert. Bei Verwendung homologer Fibroblasten und/oder Myofibroblasten, d. h. von Fibroblasten und/oder Myofibroblasten aus einem Menschen, aber nicht unbedingt dem Patienten, sollte auf gleiche HLA-Typisierung geachtet werden. Fibroblastenpopulationen können dabei z. B. aus peripheren Blutgefäßen, sowohl Arterien als auch Venen, gewonnen werden. Hierzu bietet sich insbesondere die Arteria radialis des Unterarmes an, die wegen der arteriellen Doppelversorgung des Armes in den meisten Fällen zur schadlosen Explantation zur Verfügung steht. Alternativ können Gefäßzellen aus Blutgefäßen des Beines, z. B. der Vena saphena, gewonnen werden. Denkbar ist weiter die Gewinnung von Fibroblasten oder Myofibroblasten aus pluripotenten Stammzellen oder genetisch manipulierten Zellen.

Die Zellen können beispielsweise aus Gefäßfragmenten gewonnen werden, in dem die Gewebestückchen zunächst, wie in Zünd et al. (Eur. J. Cardiothorac. Surg. 13, 160, 1998) beschrieben, in Gewebebruchstücke zerstückelt und ca. 1 bis 2 Wochen unter normalen Zellkulturbedingungen (37°C, 5 CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert werden, bis die Zellen auf dem Boden der Kulturschale eine konfluente Zellschicht bilden. Anschließend werden sie mehrfachen Passagen unterworfen, um eine von restlichem Gewebematerial freie Zellkultur zu erhalten. Nach zwei bis drei Passagen können die gemischten Zellpopulationen gereinigt werden, in dem sie mit einem für Endothelzellen spezifischen Fluoreszenzmarker (Dil-Ac-LDL, von Medical Technologies

Inc., Stoughton, MA) inkubiert werden und mittels Durchflusszytometrie (FACStar Plus, Becton Dickinson) getrennt werden. Fluoreszenzmarkierte Zellen sind Endothelzellen, nicht markierte Zellen sind Fibroblasten und Myofibroblasten. Diese werden weitere zwei bis drei Wochen kultiviert und während dieser Zeit zwei bis vier Passagen unterworfen, um eine ausreichende Anzahl an Zellen für die anschließende Besiedelung des Trägers zu erhalten.

In den so erhaltenen Fibroblastenkulturen liegen Fibroblasten und Myofibroblasten gemischt vor. Das Verhältnis beider Populationen schwankt. Es ist bevorzugt, Kulturen zu verwenden, in denen der Fibroblastenanteil überwiegt; besonders bevorzugt ist ein Fibroblastenanteil von mehr als 75%. Eine wie beschrieben gereinigte oder jede andere reine Fibroblasten/Myofibroblastenkultur kann nunmehr zur Besiedelung des Polymerträgers eingesetzt werden. Dazu werden pro Quadratzentimeter des Trägers ca. 10<sup>5</sup> bis 5 × 10<sup>8</sup> Fibroblasten und/oder Myofibroblasten eingesetzt. Unter "Oberfläche" ist in diesem Fall nicht die tatsächliche Oberfläche des Polymers, sondern die bei Betrachtung des Trägers von oben in einer Ebene erkennbare Fläche gemeint. Üblicherweise werden den Fibroblasten 60 bis 90 min. Zeit gegeben, um sich an den Träger anzuheften. Anschließend kann das überstehende Medium entfernt werden und ein weiteres Mal Fibroblastensuspension zugegeben werden. Idealerweise lässt man jedoch zwischen der ersten und zweiten Zugabe von Fibroblastensuspension 2 bis 36 Stunden, bevorzugt 24 Stunden verstrecken.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens werden dem Träger bzw. sich der nach der erstmaligen Fibroblastenzugabe allmählich ausbildenden Matrix weitere 3- bis 14mal, besonders bevorzugt 5- bis 10mal Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zugefügt.

Unter den üblicherweise für das Zellwachstum von Fibroblasten verwendeten Bedingungen (z. B. 5% CO<sub>2</sub>, Inkubation bei 37°C, steriles Medium) entwickelt sich nach ca. ein bis drei Wochen eine solide bindegewebige Struktur. Nunmehr wird diese Struktur mit einer reinen Endothelzell-Suspension inkubiert. Die Endothelzellen können genauso wie die Fibroblasten durch FACS angereichert und anschließend in mehreren Passagen (bevorzugt 3) expandiert werden. Auch für Endothelzellen ist es bevorzugt, die Besiedelung mit jeweils ca. 10<sup>5</sup> bis 5 × 10<sup>8</sup> Endothelzellen mehrfach zu wiederholen, z. B. 3- bis 14mal. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Besiedelung mit Endothelzellen 5- bis 10mal wiederholt. Zwischen zwei Besiedelungsschritten sollten mindestens 60 min., bevorzugt jedoch 2 bis 24 Stunden liegen.

Bei den zum Besiedeln des Trägers verwendeten Zellen handelt es sich bevorzugt um humane Zellen. Besonders bevorzugt ist es jedoch, autologe Fibroblasten und/oder Myofibroblasten sowie Endothelzellen zu verwenden. Dazu wird dem Patienten, dessen Herzklappe ersetzt werden soll, Gewebe z. B. aus einem seiner Gefäße entnommen. Wie oben bereits erwähnt, bieten sich dazu die Arteria radialis sowie die Vena saphena an. Die Verwendung der autologen Zellen zur Konstruktion der Herzklappe hat den wesentlichen Vorteil, daß die Klappe nach Implantation in den Patienten kein körperfremdes Gewebe darstellt und somit Immunreaktionen gegen die künstliche Herzklappe so gut wie ausgeschlossen erscheinen.

Ca. 14 Tage nach Zugabe der Endothelzellen lässt sich histologisch und immunhistochemisch ein herzklappenanaloges Gewebe mit einem superfiziellem Einzelzellschicht aus Endothelzellen und einer bindegewebigen Grundstruktur nachweisen. Dieses Gewebe ist jedoch zur Implantation in ein menschliches Herz nur bedingt geeignet, da es auf Grund seiner zu schwachen mechanischen Eigenschaften

den dort herrschenden Strömungsverhältnissen nicht gewachsen wäre.

Erfnungsgemäß wird nunmehr in einem weiteren Verfahrensschritt die vorgebildete herzklappenanaloge Struktur in eine pulsatile Flusskammer eingebracht, in der sie steigenden Flussraten ausgesetzt werden kann. Es wurde festgestellt, daß durch eine langsame Adaptation der Flussraten die Bildung einer strömungsbeständigen herzklappenanalogen Struktur erreicht werden kann.

Zum Durchführen des erfundungsgemäßen Verfahrens eignet sich ein Bioreaktor. Dieser Bioreaktor sollte möglichst kompakt ausgebildet sein, um in üblichen Zellinkubatoren eingesetzt werden zu können. Der Bioreaktor sollte eine Flusskammer aufweisen, in der das Klappenventil angeordnet ist. Der Antrieb zum Pumpen des Fluids durch die Flusskammer sollte dabei außerhalb der Flusskammer angeordnet sein. Dies wird bei dem verwendeten Bioreaktor durch eine der Flusskammer benachbarte Luftkammer erzielt, die durch eine hochelastische Membran von der Flusskammer getrennt ist. Durch pulsierendes Ändern des Luftdrucks in der Luftkammer kann ein Fördern des Fluids durch die Flusskammer erzeugt werden. Anstelle von Luft könnte auch eine Flüssigkeit oder ein anderes Gas in der Luftkammer aufgenommen sein, die dann allgemein auch als Antriebsmediumkammer bezeichnet werden kann. Dann müßte dieses Gas oder das darin befindliche Fluid jeweils pulsierenden Druckänderungen unterworfen werden. Luft läßt sich jedoch besonders leicht handhaben und hat sich daher als besonders geeignet für das Betreiben des Bioreaktors erwiesen.

Aufgrund der Luftkammer kann der Antrieb zum Fördern des Fluids in der Flusskammer sehr kompakt gestaltet werden und auch außerhalb des Inkubators angeordnet sein. Es läßt sich dadurch eine Trennung herbeiführen zwischen dem Teil, der unmittelbar auf die Flusskammer wirkt, und dem Teil, der die Druckschwankungen in der Luftkammer, bzw. Antriebsmediumkammer erzeugt. So kann z. B. eine Respiratorpumpe außerhalb des Inkubators angeordnet sein, die über einen dünnen Schlauch mit der Luftkammer, bzw. Antriebsmediumkammer verbunden ist. Dadurch läßt sich die Gestaltung des Bioreaktors und der Antrieb selbst den jeweiligen Einbauerfordernissen anpassen.

Für das erfundungsgemäße Verfahren verwendete pulsatile Flusskammer ist Bestandteil eines Bioreaktors. Eine bevorzugte Ausführungsform des Bioreaktors wird nachfolgend mit Bezug auf die Abb. 2 und 3 detailliert beschrieben. Es versteht sich, daß sowohl der Bioreaktor als auch die ihn umfassende Anordnung nicht nur im erfundungsgemäßen Verfahren, sondern auch davon unabhängig verwendet werden könnten.

Es zeigen:

Abb. 2 den Bioreaktor in einer Schnittansicht;

Abb. 3 eine Anordnung zum Betreiben des Bioreaktors aus Abb. 2.

In Abb. 2 ist ein Bioreaktor 1 in einer Schnittansicht dargestellt. Der Bioreaktor ist um die in der Abb. 2 dargestellte vertikale Symmetriechse im wesentlichen rotationssymmetrisch. Es handelt sich bei dem Bioreaktor um einen sogenannten Kompaktbioreaktor, dessen Außendurchmesser in radialer Richtung ca. 15,5 cm und dessen Höhe ca. 16,8 cm beträgt. Der Betrieb kann auch in Standard-Zellinkubatoren erfolgen.

Der Bioreaktor 1 verfügt über ein Gehäuse 2, mit zwei Kammern 3 und 4, die durch einen Membran 5 voneinander getrennt sind. Die untere Kammer 3 bildet eine Luftkammer und die obere Kammer 4 eine Flusskammer, die in zwei Teile unterteilt ist, wobei ein Teil durch einen Fluidkammerabschnitt 6 und der andere Teil durch einen Ventilperfusions-

kammerabschnitt 7 gebildet wird. Der Fluidkammerabschnitt 6 und der Ventilperfusionskammerabschnitt 7 sind über einen Durchgang 8 miteinander verbunden.

Die Kammern kommunizieren mit der Umgebung über 5 Anschlüsse 9, 10 und 11, wobei Anschluß 9 in die Kammer 3, Anschluß 10 in den Fluidkammerabschnitt 6 der Flusskammer 4 und Anschluß 11 in den Ventilperfusionskammerabschnitt 7 der Flusskammer 4 mündet. Die Anschlüsse 9, 10 und 11 sind jeweils als über das Gehäuse vorstehende Rohr-10 stutzen ausgebildet, auf die Schläuche oder Leitungen in bekannter Weise aufsteckbar sind.

Das Gehäuse ist dreiteilig ausgebildet, mit einem unteren Gehäuseteil 12, einem mittleren Gehäuseteil 13 und einem oberen Gehäuseteil 14. Das untere Gehäuseteil 12 ist im wesentlichen schalenförmig mit einem Boden 15 und einer im wesentlichen ringförmig verlaufenden Wand 16. Die der Wand 16 abgewandte Seite des Bodens bildet gleichzeitig die Auflagefläche für den Bioreaktor, mit der er z. B. auf einem Tisch aufgesetzt werden kann. Der Anschluß 9 erstreckt sich im wesentlichen radial aus der Wand 16 heraus. Die Wand 16 weist eine Flanschfläche 17 auf, in der sich in Axialrichtung erstreckende Gewindebohrungen 18 eingelassen sind. Um ein Beobachten der Vorgänge im Innern der Kammer 3 zu erleichtern, ist das untere Gehäuseteil aus 20 durchsichtigem Material, z. B. Plexiglas (Polymethylmethacrylat, PMMA), hergestellt.

Das mittlere Gehäuseteil 13 ist ebenfalls im wesentlichen rotationssymmetrisch um die Symmetriechse des Bioreaktors und verfügt über eine im wesentlichen zylindrische 30 Wand 19, an die sich ein Deckelabschnitt 20 anschließt, sowie über einen Flansch 21 auf der dem Deckelabschnitt 20 abgewandten Seite der Wand 19. Der Flansch 21 ist im wesentlichen ringförmig mit einer der Flanschfläche 17 zugewandten Flanschfläche 22, die sich radial erstreckt. Im 35 Flansch 21 sind zudem Durchgangsbohrungen 23 vorgesehen, denen jeweils fluchtend eine der Gewindebohrungen 18 zugeordnet ist. Die Durchgangsbohrungen 23 und Gewindebohrungen 18 sind gleichmäßig am Umfang verteilt, wobei die bevorzugte Ausführungsform über neun Gewindebohrungen 18 mit zugehörigen Durchgangsbohrungen 23 verfügt.

Zwischen den beiden Flanschflächen 17 und 22 befindet sich die Membran 5. Durch die Membran 5 werden die beiden Kammern 3 und 4 voneinander getrennt. Die Membran besteht aus hochelastischem Silikon, das in der Art eines Trommelfells zwischen die Flanschflächen 17 und 22 gespannt ist. Die Membran weist eine Dicke von ca. 0,5 mm auf, und kann dabei so ausgebildet sein, daß im montierten Zustand ihr Außendurchmesser im wesentlichen dem Außendurchmesser des unteren und des mittleren Gehäuseteils entspricht. Dann muß die Membran mit Öffnungen im Bereich der Durchgangsbohrungen 23 versehen sein. Um die Membran 5 fest zwischen den Flanschflächen 17 und 22 einzuspannen, werden durch die Durchgangsbohrungen 23 45 Schrauben 24 aus rostfreiem Stahl in die Gewindebohrungen 18 eingeschraubt, die sich auch durch die Öffnungen der Membran hindurch erstrecken. Durch die Schrauben 24 werden die Flanschflächen 22 und 17 gegeneinander gedrückt, um dadurch die Membran fest einzuspannen und eine optimale Dichtheit zu erzielen.

Während des Betriebs des Bioreaktors schwingt die Membran in Axialrichtung. Um die Belastung der Membran am Übergang von der Flanschfläche 17 und 22 zu den zugeordneten Wänden 16 und 19 zu verringern, sind dort jeweils 55 umlaufende Phasen 25 und 26 vorgesehen.

Der Fluidkammerabschnitt 6 wird somit nach unten durch die Membran 5 und nach oben durch den Deckelabschnitt 20 begrenzt. Um die Reaktionen in dem Fluidkammerabschnitt

6 visuell überwachen zu können, besteht das mittlere Gehäuseteil, wie auch das untere Gehäuseteil aus durchsichtigem Material z. B. Plexiglas.

An das mittlere Gehäuseteil 13 schließt sich das obere Gehäuseteil 14 an. Dieses ist im wesentlichen glockenförmig und über eine Flanschverbindung mit dem mittleren Gehäuseteil verbunden. Für diese Flanschverbindung verfügt das mittlere Gehäuseteil 13 in seinem Deckelabschnitt über sechs Gewindebohrungen 27, die sich in Axialrichtung erstrecken und gleichmäßig am Umfang verteilt sind. Die Gewindebohrungen 27 sind dabei in einer radial verlaufenden Flanschfläche 28 angeordnet, die eine umlaufende Nut 29 zur Aufnahme eines Dichtelements aufweist. Ein solches Dichtelement kann z. B. ein O-Ring sein. Die Nut 29 ist gegenüber den Gewindebohrungen 27 radial nach innen versetzt.

Das obere Gehäuseteil 14 verfügt über einen Flanschring 30 mit Durchgangsbohrungen 31 und einer der Flanschfläche 28 zugewandten Flanschfläche 32. Das obere Gehäuseteil 14 steht mit seiner Flanschfläche 32 auf der Flanschfläche 28 auf und ist über Schrauben 33 aus rostfreiem Stahl, die durch die Durchgangsbohrungen 31 gesteckt und in die Gewindebohrungen 27 jeweils eingeschraubt werden, mit dem mittleren Gehäuseteil 13 fest verbunden. Das Dichtelement wird dabei von der Flanschfläche 32 in die Nut 29 gedrückt und dichtet den Ventilperfusionskammerabschnitt 7 zur Umgebung hin ab. Der Anschluß 11 ist in der Spalte des oberen Gehäuseteils 14 angeordnet. Analog der beiden anderen Gehäuseteile 12 und 13 besteht das obere Gehäuseteil 14 aus durchsichtigem Material z. B. Plexiglas.

Wie bereits eingangs erwähnt, sind der Fluidkammerabschnitt 6 und der Ventilperfusionskammerabschnitt 7 über einen Durchgang 8 miteinander verbunden. Dieser Durchgang 8 wird durch eine Durchgangsbohrung 34 im Deckelabschnitt 20 des mittleren Gehäuseteils 13 gebildet. In diese Durchgangsbohrung 34, die sich axial erstreckt, ist ein Rohr 35 eingeschoben, das sich über den Deckelabschnitt 20 hinaus erstreckt. Auf den Rohrschnitt des Rohrs 35, der sich über den Deckelabschnitt 20 des mittleren Gehäuseteils 13 hinaus erstreckt, ist ein Silikonrohr 36 aufgesteckt. Dieses Silikonrohr ist abnehmbar. Am Außendurchmesser des Silikonrohrs ist eine ringförmige Stufe 37 vorgesehen. Durch die Gestaltung des Silikonrohrs 36 und der Stufe 37 ist es möglich, Ventile auf das Silikonrohr 36 aufzustecken. Auch ist es möglich, in das Silikonrohr 36 Ventile oder Filter einzustecken, da das Rohr 35 einen kleineren Innendurchmesser als das Silikonrohr 36 aufweist oder dadurch die Stirnseite des Rohrs 35 eine Anlagefläche für einen Filter oder dergleichen bilden kann. Im vorliegenden Fall ist das Ventil ein nicht näher dargestelltes 2-segeliges oder 3-segeliges Klappenventil, das dem oben beschriebenen Träger, bzw. der Matrix entspricht, und als Rückschlagventil arbeitet, um einen Fluidstrom nur von dem Fluidkammerabschnitt zu dem Ventilperfusionskammerabschnitt zu ermöglichen. Das Klappenkonstrukt des Klappenventils ist auf einen Silikonring eingenäht. Zum Befestigen des Klappenventils am Silikonrohr wird der Silikonring auf das Silikonrohr gesteckt und durch Reibschlüsse gehalten.

An der Unterseite des Deckelabschnitts ist eine ringförmige Vertiefung 38 vorgesehen, die konzentrisch zum Rohr 35 verläuft und in die das Rohr 35 mündet. Diese Vertiefung 38 kann z. B. als Aufnahme für Filtermaterialien oder dergleichen dienen.

Im weiteren wird eine Bioreaktoranordnung mit dem oben beschriebenen Bioreaktor 1 beschrieben. Zum Betreiben des Bioreaktors ist eine Respiratorpumpe 39 vorgesehen, die über einen Silikonschlau 40 und den Anschluß 9 mit der Kammer 3 verbunden ist. Die Respiratorpumpe er-

zeugt einstellbare Druckimpulse, durch die der Druck der Kammer periodisch erhöht werden kann. Die Respiratorpumpe ist eine gesteuerte Zweiphasen Respiratorpumpe, die als Luftpumpe funktioniert. Mit der Pumpe kann das Pumpvolumen und die Pumpfrequenz eingestellt werden, wobei der Fluß in einem Bereich von 50 ml pro Minute bis 5000 ml pro Minute liegt, und der Systemdruck zwischen 20 und 240 mmHg variieren kann.

Ein Reservoir 41 ist über Silikonschläuche 42 und 43 jeweils mit den Anschlüssen 10 und 11 verbunden. Durch die Silikonschläuche 42 und 43 und das Reservoir 41 entsteht ein Kreislauf, wobei Fluid aus den Ventilperfusionskammerabschnitt 7 über den Anschluß 10, den Silikonschlau 42 in das Reservoir 41 und von dort aus über den Silikonschlau 43 und den Anschluß 10 in den Fluidkammerabschnitt 6 gefördert werden kann.

Der Bioreaktor 1 und das Reservoir 41 mit den Silikonschläuchen 42 und 43 befinden sich in einem standardisierten Inkubator 44 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Nachfolgend wird die Wirkungs- und Funktionsweise des Bioreaktors näher erläutert:  
Über die Respiratorpumpe 39 werden Druckimpulse in die Kammer 3 geleitet. Aufgrund dieser Druckimpulse dehnt sich die Membran 5 aus, wobei sie sich in der Darstellung in Abb. 2 mit jedem Druckimpuls nach oben wölbt und dabei auch zu einem Druckanstieg in dem Fluidkammerabschnitt 6 der Flusskammer 4 führt. Dieser Druckanstieg wird in den Durchgang 8 weitergeleitet und öffnet dadurch das nicht näher dargestellte Klappenventil am Silikonrohr 36. Auf diese Weise wird das im Fluidkammerabschnitt 6 vorhandene Fluid in den Ventilperfusionskammerabschnitt 7 gefördert. Aus dem Ventilperfusionskammerabschnitt 7 wird Fluid dann über den Anschluß 11 und den Silikonschlau 42 in das Reservoir 11 gefördert. Von dort aus kann es über den Silikonschlau 43 in den Fluidkammerabschnitt 6 zurückgefördert werden. Bei abfallendem Druck in der Kammer 3 wird die Membran 5 wieder aufgrund ihrer Eigenspannung in ihre Ausgangsstellung rücküberführt, in welcher sie sich im wesentlichen radial erstreckt. Durch den Druckabfall erfolgt auch in dem Fluidkammerabschnitt 6 ein Druckabfall, der wiederum zu einem Schließen des als Klappenventils ausgebildeten Ventils führt.

Durch den pulsierenden Druckanstieg in der Kammer kann somit ein Kreislauf erzeugt werden, der im wesentlichen die physiologischen Flussbedingungen im Herzen simuliert. Aufgrund der Konstruktion des neuartigen Bioreaktors wird eine hohe Dichtigkeit des Fluidkammerabschnitts 6 und des Ventilperfusionskammerabschnitts 7 erreicht. Aufgrund des dadurch möglichen Schutzes vor Infektionen können lange Kultivierzeiten ermöglicht werden. Durch den Antrieb mit Luft über die Kammer 3, die durch die Membran 5 hermetisch von der Fluidkammer 6 getrennt ist, lassen sich die Probleme von Hitzeentwicklungen innerhalb des Inkubators 44 vermeiden, da der eigentliche Pumpmotor (Respiratorpumpe) sich außerhalb des Zellinkubators befindet.

Da der gesamte Bioreaktor transparent ist, kann man die Klappenkonstruktion permanent einsehen und das Öffnen und Schließen der Klappen kontrollieren. Weiterhin kann man an der Färbung der Nährflüssigkeit pH-Veränderungen erkennen. Das Reservoir mit dem Fluid kann durch sterile Konnektoren an die Silikonschläuche angeschlossen werden. Dadurch läßt sich ein sicherer Fluidwechsel ermöglichen.

Aufgrund der einfachen Konstruktion des Bioreaktors kann ein Austausch der Ventile bzw. der Herzklappen auf einfache Weise durchgeführt werden. Dazu müssen nur die Schrauben 33 gelöst und das obere Gehäuseteil 14 abge-

nommen werden. Das Ventil bzw. die Herzklappe kann dann ausgetauscht werden und anschließend kann das obere Gehäuseteil 14 durch die Schrauben 33 wieder am mittleren Gehäuseteil befestigt werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden Flußraten zwischen 50 ml/min. und 5000 ml/min., bevorzugt 50 ml/min. bis 2000 ml/min verwendet. Die Angaben beziehen sich auf den Fluß durch die Klappenprothese. Als anfängliche Flußrate haben sich Flußraten von 50 bis 100 ml/min. als geeignet erwiesen. Diese Flußraten werden z. B. mit einer Pulsfrequenz von 5 bis 10 Pulsen pro Minute durch die Herzklappe geschickt. Die Flußrate wird anschließend kontinuierlich oder diskontinuierlich auf bis zu 5000 ml/min. gesteigert. Gleichzeitig wird die Pulsfrequenz auf bis zu 180 Pulse/min. angehoben. Bei den angegebenen Daten handelt es sich um die Grenzwerte, die normalerweise nicht überschritten werden.

In bevorzugten Ausführungsformen wird die Flußrate bis auf 2000 ml/min. gesteigert, während die Pulsfrequenz auf 70 bis 100, bevorzugt 80 Pulse/min. angehoben wird. Die Belastung der sich stabilisierenden Herzklappe wird damit nahezu physiologischen Verhältnissen angepaßt. Es hat sich als günstig, aber nicht notwendig erwiesen, die Flußrate und die Pulsfrequenz jeweils nach ca. 24 bis 48 Stunden zu steigern. So kann beispielsweise, ausgehend von einer Flußrate von 50 bis 100 ml/min. und einer Pulsrate von 5 bis 10 Pulsen/min., am Tag 1 des Aufenthaltes in der pulsatilen Flußkammer, am Tag 3 eine Erhöhung auf 300 ml/min. bei 20 bis 25 Pulsen/min., am Tag 5 auf 700 ml/min. und 35 bis 45 Pulsen/min., am Tag 7 auf 1000 ml/min und 50 bis 60 Pulsen/min., am Tag 9 auf 1300 ml/min. und 70 bis 80 Pulsen/min., am Tag 11 auf 1500 ml/min. und ca. 100 Pulsen/min., am Tag 13 auf 1750 ml/min. und ca. 120 Pulsen/min. und am Tag 15 auf 2000 ml/min. und 140 Pulsen/min. vorgesehen werden. Je nach zur Verfügung stehender Zeit, Größe der Klappe, Größe und Alter des Patienten etc. kann jedoch eine sehr viel langsamere Steigerung der Flußraten sowie der Pulsfrequenz oder die Steigerung auf höhere Flußraten und Pulsfrequenzen sinnvoll sein.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden die in der pulsatilen Flußkammer herrschenden systemischen Drücke auf 10 bis 240 mmHg eingestellt. Bevorzugt sind systemische Drücke von 60 bis 140 besonders bevorzugt sind systemische Drücke von 80 bis 120 mmHg.

Die mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellte homologe bzw. autologe Herzklappe weist gegenüber den herkömmlichen mechanischen und biologischen Herzklappen wesentliche Vorteile auf. So besteht sie in ihrer bevorzugten Ausführungsform aus autogenen Gewebe, d. h. aus Gewebe des zur Herzklappenoperation anstehenden Patienten, und vermeidet dadurch jede Fremdkörperreaktion des Klappenempfängers. Die Infektionsgefahr bei Empfängern autologer Herzklappen unterscheidet sich nicht von der eines gesunden Herzens. Eine Antikoagulationstherapie ist nicht erforderlich; damit entfällt die Gefahr hemorragischer Komplikationen. Der bei weitem überzeugendste Vorteil der erfindungsgemäßen Herzklappe ist jedoch die Tatsache, daß sie lebendes Gewebe darstellt und daher nach Implantation bei Wachstum des Herzklappenermpfängers mitwächst. Das macht die erfindungsgemäße Herzklappe zur Klappe der Wahl vor allem bei Kindern und jugendlichen Patienten, deren Herz sich entwicklungsbedingt noch vergrößert. Die lebende Herzklappe wächst entsprechend mit, so daß auch bei Veränderungen des Herzens keine Dysproportionen (z. B. Verengungen) zwischen Klappe und Herz auftreten.

Die erfindungsgemäße Herzklappe enthält eine bindegewebige innere Struktur, die neben Fibroblasten und Myofi-

broblasten im wesentlichen Bestandteile einer normalen extrazellulären Matrix, nämlich Kollagen, Elastin und Glycosaminoglykane enthält. Im Gegensatz zu früheren Versuchen, durch "Tissue Engineering" Herzklappengewebe herzustellen, weisen die erfindungsgemäßen Klappen einen der nativen Klappe bzw. dem nativen Klappensegel entsprechenden Anteil an Kollagen (43–55%), Elastin (11–13%) und Glycosaminoglycan auf.

Es konnte gezeigt werden, daß die erfindungsgemäßen Herzklappen Flußraten von mehr als 2000 ml/min., entsprechend den in einem erwachsenen Humanherzen herrschenden Flußverhältnissen, standhalten. Somit kann erfindungsgemäß erstmals eine autologe Herzklappe zur Verfügung gestellt werden, die bedingungslos zur Implantation in kindliche wie auch erwachsene Patienten geeignet ist.

Die folgenden Abbildungen und Beispiele erläutern die Erfindung.

**Abb. 1a** zeigt einen aus einem Polymer vorgebildeten Träger, der anschließend einer Besiedlung mit Fibroblasten/Myofibroblasten und Endothelzellen unterworfen wird. **Abb. 1b** zeigt den Träger/die Matrix nach Besiedelung und einer Woche Inkubation in der pulsatilen Flußkammer. **Abb. 1c** zeigt die gleiche Klappenprothese nach 2 Wochen Inkubation in der Flußkammer.

**Abb. 2** zeigt einen Bioreaktor einschließlich einer pulsatilen Flußkammer in Schnittansicht.

**Abb. 3** zeigt den Gesamtaufbau, in den der Bioreaktor integriert ist.

30

### Beispiel 1

#### Herstellung von Trägern

Zum Herstellen des herzkloppenförmigen Trägers wird ein nicht-gewebtes Polyglycolsäurepolymer (Fiberdurchmesser 12–15 µm, Polymerdichte: 70 mg/ml, Albany International Research, Mansfield MA, USA) verwendet. Das Polymer wird in der Art zugeschnitten, daß es eine Röhre mit 19 mm Durchmesser bildet. In diesen Conduit werden 35 3 dreieckige Segel eingenäht. Dieser Träger kann zum Herstellen von 3-segeligen Klappen, d. h. Pulmonal-, Aorten- und Tricuspidalklappen verwendet werden. Für Mitralklappen werden 2 Segel eingenäht.

45

### Beispiel 2

#### Herstellung einer dreisegeligen Herzklappenprothese

Ein dreisegelter Träger wird sterilisiert und in Medium 50 (DMEM, GIBCO BRL-Life Technologies) für 24 Stunden eingelegt, um die Polymeroberfläche einzuhüften. Daraufhin wird der klappenförmige Träger pro Quadratzentimeter Oberfläche mit 4 Mio. Fibroblasten alle 90 Minuten insgesamt 6 mal besiedelt. Weiterhin wird der besiedelte Träger für 2 Wochen inkubiert (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit). Das Medium wird alle 4 Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt. Anschließend werden Endothelzellen auf den besiedelten klappenförmigen Träger aufgebracht (3–4 Mio. Endothelzellen pro Quadratzentimeter Oberfläche, 55 6 Besiedlungen alle 90 Minuten). Nach weiteren 2 Wochen wird das entstandene Gewebe in die Flußkammer des Bioreaktors unter sterilen Kautelen eingebracht und hier mittels des Silikonringes in Durchflußposition installiert. Anschließend wird der Bioreaktor mit Medium gefüllt und in den Zellinkubator gestellt. Nachdem über den Druckluftschlauch die Konnektion zur außerhalb des Inkubators stehenden Pumpe hergestellt wurde, wird mit minimalen pulsatilen Flüssen begonnen (50 ml/min). In 2 Tages-Schritten

wird die Flußrate und Pulsrate gesteigert auf 100 ml/min (Puls 10), 300 ml (Puls 25), 700 ml (Puls 35), 1000 ml (Puls 60) für insgesamt weitere 4 Tage. Anschließend (nach 14 Tagen) wird das nun gebildete Gewebe unter sterilen Bedingungen entnommen und zur biochemischen, histologischen und mechanischen Analyse asserviert.

## Patentansprüche

1. In vitro-Verfahren zum Herstellen einer homologen Herzklappe, umfassend die folgenden Schritte:
  - Bereitstellen eines biologisch abbaubaren Trägers,
  - Besiedeln des Trägers mit homologen Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zur Ausbildung einer bindegewebigen Matrix,
  - Besiedeln des Trägers/der Matrix mit Endothelzellen,
  - Einbringen des Trägers/der Matrix in eine pulsatile Flusskammer, in der er/sie steigenden Flussraten ausgesetzt werden kann, und
  - kontinuierliches oder diskontinuierliches Erhöhen der Flussrate.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der biologisch abbaubare Träger eine biologisch abbaubare Polymermatrix oder eine azelluläre biologische Matrix ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger eine Polyglycolsäure (PGA), Polymilchsäure (PLA), Polyhydroxyalcanoat (PHA), Poly-4-Hydroxybutyrat (P4HB) oder eine Mischung aus zwei oder mehreren dieser Polymere umfaßt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der biologisch abbaubare Träger in Form einer Herzklappe vorgebildet ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger eine Polymerdichte von 40 bis 120 mg/cm<sup>3</sup>, bevorzugt 50 bis 80 mg/cm<sup>3</sup> aufweist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein poröses Polymer mit einer Porengröße von 80 bis 240 µm ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Fasern des Trägers einen Durchmesser von 6 bis 20 µm, bevorzugt 10 bis 18 µm aufweisen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein Bindegewebsgerüst einer Tier-Herzklappe ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt des Besiedelns mit Fibroblasten und/oder Myofibroblasten 3- bis 14mal, bevorzugt 5- bis 10mal wiederholt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß pro Quadratzentimeter Träger/Matrix und Besiedlungsschritt ca.  $10^5$  bis  $5 \times 10^6$  Fibroblasten und/oder Myofibroblasten eingesetzt werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt des Besiedelns mit Endothelzellen 3- bis 14mal, bevorzugt 5- bis 10mal wiederholt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß pro Quadratzentimeter Träger/Matrix und Besiedlungsschritt ca.  $10^5$  bis  $5 \times 10^6$  Endothelzellen eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, da-

durch gekennzeichnet, daß die Fibroblasten und/oder Myofibroblasten und/oder Endothelzellen humane Zellen sind.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblasten und/oder Myofibroblasten und/oder Endothelzellen autologe Zellen sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß in der pulsatilen Flusskammer Flussraten von 50 ml/min bis 5000 ml/min, bevorzugt 50 bis 2000 ml/min eingestellt werden.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Flussrate über einen Zeitraum von 1 Woche bis 12 Wochen gesteigert wird.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die anfängliche Flussrate 50 bis 100 ml/min beträgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die anfängliche Pulsfrequenz 5 bis 10 Pulse/min beträgt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Flussrate bis auf 5000 ml/min gesteigert wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Pulsfrequenz bis auf 180 Pulse/min gesteigert wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß in der pulsatilen Flusskammer systemische Drücke von 10 bis 240 mmHg eingestellt werden.
22. Homologe Herzklappe, herstellbar durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21.
23. Homologe Herzklappe mit einem bindegewebigen inneren Kern, der von einer Endothellschicht umgeben ist, dadurch gekennzeichnet, daß in dem bindegewebigen Kern eine Kollagendichte von 43 bis 55%, bezogen auf die Matrix, gegeben ist.
24. Homologe Herzklappe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Strömungsbedingungen im menschlichen Herzen standhält.

---

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

---

**Abb. 1 a**

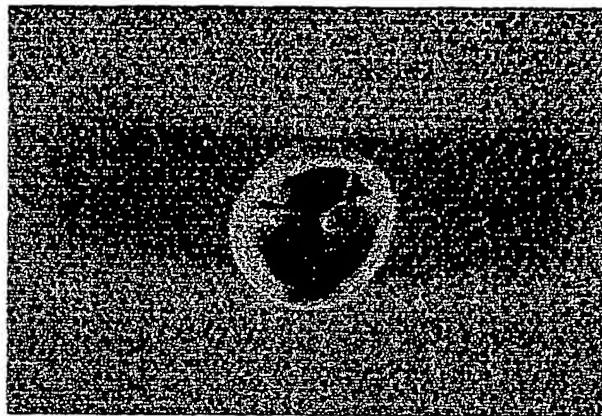


Abb. 1 b

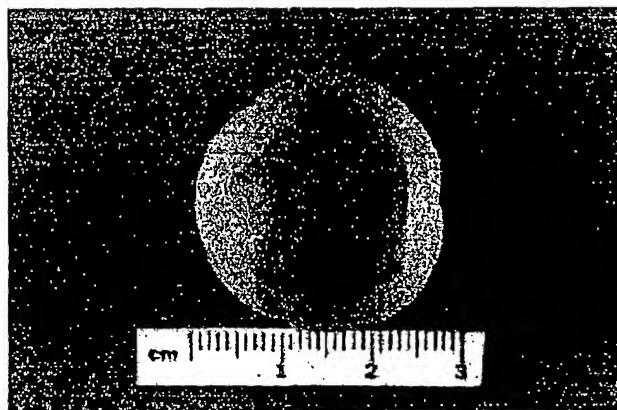


Abb. 1 c

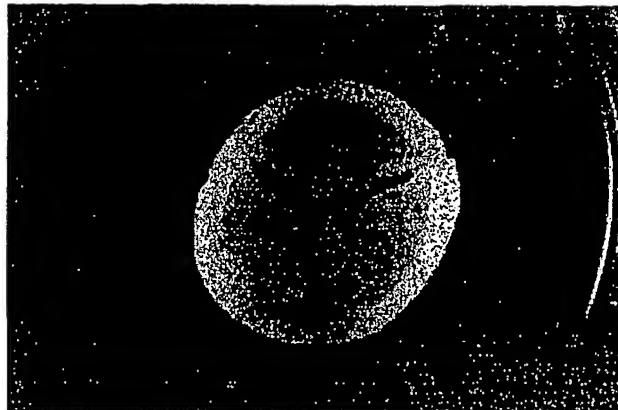


Abb. 2

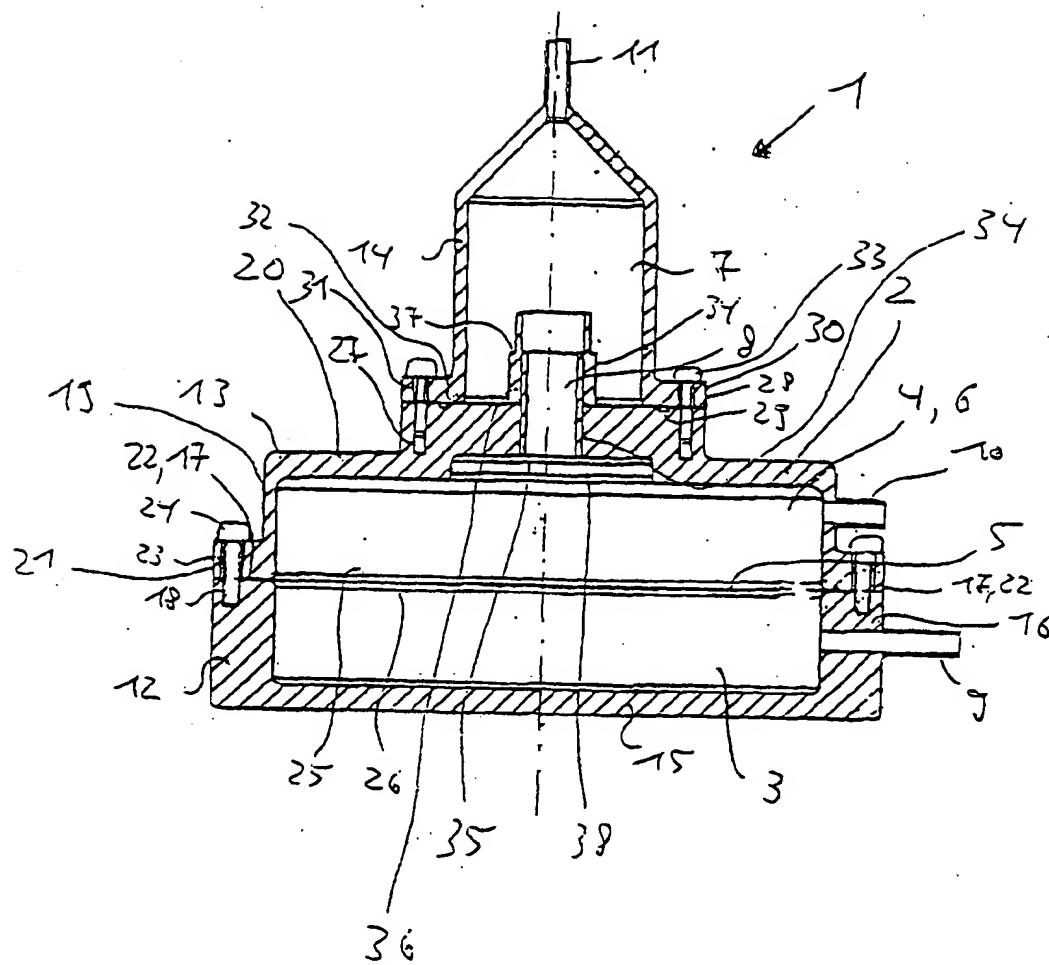


Abb. 3

